



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110221066 A

(43)申请公布日 2019.09.10

(21)申请号 201910604044.8

G01N 21/64(2006.01)

(22)申请日 2019.07.05

(71)申请人 吉林大学

地址 130022 吉林省长春市前进大街2699号

(72)发明人 刘明远 刘晓雷 杨勇 王学林

白雪 唐斌 丁静 王楠 张小波

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

代理人 邓宇

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

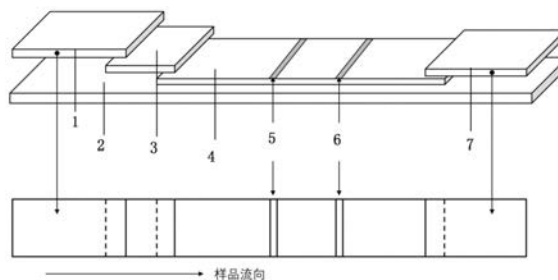
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用

(57)摘要

一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用,属于荧光免疫检测技术领域。为了更快速、稳定、准确检测旋毛虫感染,本发明提供了一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条,包括样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板,所述结合垫上标记有时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG;所述层析膜上设有检测线与质控线,其中检测线上喷涂由旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原与旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原组成的旋毛虫肌幼虫ES混合抗原;所述质控线上喷涂有兔抗山羊IgG,将上述各组分组合后制备成试纸条,本发明可用于猪旋毛虫病的快速检测。



1. 一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条,包括样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板,其特征在于,所述结合垫上标记有时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG;所述样品垫上设置有加样孔;所述层析膜上设有检测线与质控线,其中检测线上喷涂有旋毛虫肌幼虫ES混合抗原,所述旋毛虫肌幼虫ES混合抗原由旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原与旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原组成;所述质控线上喷涂有兔抗山羊IgG。

2. 根据权利要求1所述的旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条,其特征在于,所述样品垫材质为玻璃纤维素膜XQ-Y8;所述结合垫材质为玻璃纤维素膜Ahistrom8964;所述层析膜材质为硝酸纤维素膜Millipore135。

3. 权利要求1所述的旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 旋毛虫肌幼虫ES混合抗原制备:将旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原及旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原,按照1:1的质量比混合,获得旋毛虫肌幼虫ES抗原;

2) 结合垫的制备:将时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG喷涂在结合垫上,真空抽干后干燥保存备用;

3) 检测线和质控线的制备:将旋毛虫肌幼虫ES混合抗原与兔抗山羊IgG按照1:0.625的质量比,分别喷涂在层析膜上,形成检测线与质控线,37℃干燥2-3h,使用封闭剂浸泡干燥后的层析膜1-2h,随后37℃干燥1-2h,密封保存备用;

4) 试纸条的组装:在底板上沿样品检测时的层析方向依次将样品垫、结合垫、层析垫、吸水垫粘贴在底板上,制成试纸条。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤1)所述旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原的制备方法如下:将旋毛虫肌幼虫用含有青霉素和链霉素的培养液洗涤后自然沉淀20-30min,然后将其放入含终浓度250U/mL青霉素和终浓度为250U/mL链霉素的培养液中,密度为3000-5000条/mL,37℃,10%二氧化碳,培养18-24h后收集上清,收集的上清依次经透析及3KDa超滤管浓缩后即为旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤1)所述旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原的制备方法如下:将旋毛虫肌幼虫经口感染大鼠,剂量为8000条/只,6h后处死,取出大鼠小肠,切割成碎片,放置于含有培养液的培养皿筛网上,37℃孵育2-3h,收集培养皿底部的虫体,用含有青霉素和链霉素的培养液洗涤后自然沉淀20-30min,然后将其放入含终浓度250U/mL青霉素和终浓度为250U/mL链霉素的培养液中,密度为3000-5000条/mL,37℃,10%二氧化碳,培养18-24h后收集上清,收集的上清依次经透析及3KDa超滤管浓缩后即为旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原。

6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤2)中时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG的制备方法如下:每100μL 1% (w/v)的时间分辨荧光微球中加入0.05mol/L 2-吗啉乙磺酸MES溶液400μL,16mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺NHS 50μL和8mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺EDC 50μL混匀,室温孵育1-2h;反应结束离心后弃上清,使用磷酸盐缓冲液漂洗沉淀后加入500μL磷酸盐缓冲液重悬;

然后,加入40μL的5mg/mL山羊抗猪IgG,室温孵育1-2h;

然后,加入100μL的0.1mol/L甘氨酸溶液,室温孵育30-60min,离心后弃上清,向沉淀中加入8000μL偶联储存液重悬即得;所述偶联储存液为0.05mol/L PBS溶液,每升偶联储存液

中含有Proclin300,0.5mL,BSA10g,聚乙二醇400,20g。

7.根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤2)所述喷涂,点样速度为50 μ L/cm。

8.根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤3)所述喷涂,点样速度为1 μ L/cm。

9.权利要求1所述的旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条在旋毛虫病检测中的应用。

10.根据权利要求9所述的应用,其特征在于,将待测血清用样品稀释液稀释后,加入到试纸条加样孔中,室温静置5~10min,用紫外灯照射试纸条观察结果,待测样品如果质控线和检测线均显色,则判定为阳性;如果仅质控线显色,而检测线不显色,则判定为阴性。

一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于荧光免疫检测技术领域,具体涉及一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 旋毛虫病是一种危害非常严重的人兽共患病,其不但可给畜牧业生产造成巨大的经济损失,而且对人类身体健康也构成巨大威胁,人或动物主要通过生食或半生食含有旋毛虫的肉类(主要为猪肉)而发病。

[0003] 对于屠宰动物旋毛虫病的检验,国际动物卫生组织(OIE)的法规检验方法为镜检法及集样消化法,目前我国也在延用这两种方法。然而以上两方法均存在一定的弊端,镜检法费时费力而且敏感性差,其敏感性为肉中虫体密度达到每克3条虫体时方可检出。集样消化法虽可大大提高检出率,将虫体检出率提高至每克肉1条虫体,但该方法仍十分繁琐,在发现阳性样品时仍需对阳性组采用消化法进行逐头检测。从敏感性的角度来看,由镜检法和集样消化法所造成漏检的肉类均存在安全隐患并可引起人类的感染(摄入75条虫体即可引起人的感染)。国内外学者对旋毛虫检测的方法进行了大量的研究,如应用间接荧光免疫试验,免疫酶染色试验,免疫印迹试验,免疫吸附试验(ELISA)等技术来检测旋毛虫抗体,但这些方法操作较复杂,常需要2-3个小时检测出结果,而且需要昂贵的仪器和专业技能人员在实验室完成,不能应用于现场和基层单位进行猪旋毛虫病的检测。

[0004] 免疫层析试纸快速检测技术(ILFST)是在单克隆抗体技术、免疫层析技术、新材料及标记技术基础上发展起来的一种新型免疫学快速检测技术。免疫层析试纸条不需要专业技能和昂贵复杂的仪器设备,快速性、易用性、低成本和无需设备等优点使其广泛应用于激素、病原微生物、肿瘤标记物、违禁药品、兽药、农药等靶标的快速检测,是理想的免疫学快速检测技术之一。该技术可实现现场实时检测,尤其适用于医院、兽医临床、检验检疫等领域,具有广泛的应用前景。

[0005] 免疫标记是对抗体或抗原进行标记,通过标记物的增强放大效应显示反应系统对应的抗原或抗体的相对含量。免疫标记根据其标记原理可分为两大类,一类是以酶促反应为基础的酶标记法,另一类是自显色标记法。免疫层析检测过程中,标记物是影响其敏感性的主要因素之一。而对于不需要仪器辅助的免疫层析试纸,主要是自显色标记物。目前应用较为成熟的是胶体金标记。但由于胶体金检测在灵敏度和准确度上的限制,只能用于一些要求低的检测项目中。

发明内容

[0006] 为了更快速、稳定、准确检测猪旋毛虫感染情况,本发明提供了一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条来检测旋毛虫抗体,所述旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条包括样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板,所述结合垫上标记有时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG;所述样品垫上设置有加样孔;所述层析膜上设有检测线与质控线,其中检测线上喷涂

有旋毛虫肌幼虫ES混合抗原,所述旋毛虫肌幼虫ES混合抗原由旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原与旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原组成;所述质控线上喷涂有兔抗山羊IgG。

[0007] 进一步地限定,所述样品垫材质为玻璃纤维素膜XQ-Y8;所述结合垫材质为玻璃纤维素膜Ahistrom8964;所述层析膜材质为硝酸纤维素膜Millipore135。

[0008] 本发明还提供了上述旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0009] 1) 旋毛虫肌幼虫ES混合抗原制备:将旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原及旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原,按照1:1的质量比混合,获得旋毛虫肌幼虫ES抗原;

[0010] 2) 结合垫的制备:将时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG喷涂在结合垫上,真空抽干后干燥保存备用;

[0011] 3) 检测线和质控线的制备:将旋毛虫肌幼虫ES混合抗原与兔抗山羊IgG按照1:0.625的质量比,分别喷涂在层析膜上,形成检测线与质控线,37℃干燥2-3h,使用封闭剂浸泡干燥后的层析膜1-2h,随后37℃干燥1-2h,密封保存备用;

[0012] 4) 试纸条的组装:在底板上沿样品检测时的层析方向依次将样品垫、结合垫、层析垫、吸水垫粘贴在底板上,制成试纸条。

[0013] 进一步地限定,步骤1)所述旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原的制备方法如下:

[0014] 将旋毛虫肌幼虫用含有青霉素和链霉素的培养液洗涤后自然沉淀20-30min,然后将其放入含终浓度250U/mL青霉素和终浓度为250U/mL链霉素的培养液中,密度为3000-5000条/mL,37℃,10%二氧化碳,培养18-24h后收集上清,收集的上清依次经透析及3KDa超滤管浓缩后即为旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原。

[0015] 进一步地限定,步骤1)所述旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原的制备方法如下:将旋毛虫肌幼虫经口感染大鼠,剂量为8000条/只,6h后处死,取出大鼠小肠,切割成碎片,放置于含有培养液的培养皿筛网上,37℃孵育2-3h,收集培养皿底部的虫体,用含有青霉素和链霉素的培养液洗涤后自然沉淀20-30min,然后将其放入含终浓度250U/mL青霉素和终浓度为250U/mL链霉素的培养液中,密度为3000-5000条/mL,37℃,10%二氧化碳,培养18-24h后收集上清,收集的上清依次经透析及3KDa超滤管浓缩后即为旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原。

[0016] 进一步地限定,步骤2)中时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG的制备方法如下:每100μL1% (w/v)的时间分辨荧光微球中加入0.05mol/L 2-吗啉乙磺酸MES溶液400μL,16mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺NHS 50μL和8mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺EDC 50μL混匀,室温孵育1-2h;反应结束离心后弃上清,使用磷酸缓冲液漂洗沉淀后加入500μL磷酸缓冲液重悬;

[0017] 然后,加入100μL的5mg/mL山羊抗猪IgG,室温孵育1-2h;

[0018] 然后,加入100μL的0.1mol/L甘氨酸溶液,室温孵育30-60min,离心后弃上清,向沉淀中加入8000μL偶联储存液重悬即得;所述偶联储存液为0.05mol/L PBS溶液,每升偶联储存液中含有Proclin300,0.5mL,BSA 10g,聚乙二醇400,20g。

[0019] 进一步地限定,步骤2)所述喷涂,点样速度为50 μ L/cm。

[0020] 进一步地限定,步骤3)所述喷涂,点样速度为1 μ L/cm。

[0021] 本发明还提供了上述旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条在旋毛虫病检测中的应用。

[0022] 进一步限定,将待测血清用样品稀释液稀释后,加入到试纸条加样孔中,室温静置5~10min,用紫外灯照射试纸条观察结果,待测样品如果质控线和检测线均显色,则判定为阳性;如果仅质控线显色,而检测线不显色,则判定为阴性。

[0023] 有益效果

[0024] 本发明制备的旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条主要由样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板五个基本结构单元组成,从检测时的测试端至手柄端依次叠加于支撑底板上。样品垫为经过处理的玻璃纤维素膜XQ-Y8,用于快速吸收待检样品溶液,使其通过虹吸作用向结合垫侧向流动;结合垫为玻璃纤维素膜Ahistrom8964,吸附有标记的生物活性材料:时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG,它可与待检样品溶液中的检测靶标结合形成肉眼可见的免疫复合物;层析膜为硝酸纤维素膜Millipore135,其上固定有抗原和抗体,形成“检测线”(T线)和“质控线”(C线)印迹,用于拦截带标记的免疫复合物;吸水垫为吸水纸板,用于吸收流过层析膜的待检样品溶液,以维持层析膜两端的压差,促使更多的待检样品溶液在毛细作用下向一定的方向流动,加快整个免疫层析系统的流动速度,也可防止样品的随意流动。除了样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板外,本发明的试纸条还可添加一些辅助结构,如外层塑胶膜或塑料外壳等,组装成不同类型的免疫层析试纸产品。

[0025] 本发明制备的试纸条具有操作简单、快速和结果易判读等ELISA不具备的优点,同时在检测时不与其他寄生虫阳性血清发生交叉反应,特异性及灵敏度高;且具有长期稳定的特点,实用性较强、容易保存、具有市场开发价值。具有广泛推广空间,极具市场前景。

附图说明

[0026] 图1荧光免疫层析检测试纸条结构示意图;其中1为样品垫;2为底板;3为结合垫;4为硝酸纤维素膜;5为检测线;6为质控线;7为吸水垫。

[0027] 图2荧光免疫层析检测试纸条检测结果判定示意图;其中1为加样孔;2为检测线;3为质控线;a)为阳性结果示意图;b)为阴性结果示意图;c)为无效示意图。

具体实施方式

[0028] 在旋毛虫检测方面还没有利用旋毛虫肌幼虫ES抗原作为诊断抗原检测抗旋毛虫抗体的荧光免疫层析试纸条,本发明对此进行了探究。本发明采用时间分辨免疫荧光微球作为标记物,通过对各种固相材料的选择和反应体系及反应条件的优化,建立了一种基于肌幼虫ES混合抗原作为诊断抗原的旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条。在制作试纸条时,将收集的肌幼虫ES混合抗原喷涂在NC膜检测线上,兔抗山羊IgG喷涂在其质控线上,连同喷涂有时间分辨荧光微球的羊抗猪结合垫、样品垫、吸水纸和底板进行旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条的组装。待检样品利用NC膜的毛细作用会向试纸条的上方移动,若待检样品呈阳性,试纸条的检测线和质控线均显色;如待检样品呈阴性,试纸条即只有质控线显色;若试纸条的质控线不显色即试纸条已失效。该试纸条具有特异、敏感、快速、简单等特点,不

需要任何专业技能和其他试剂,为旋毛虫抗体检测提供了新的技术平台,可广泛应用于猪旋毛虫病的基层现场快速准确初筛。下面具体描述本发明所述的旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用。

[0029] 本发明所述试剂或仪器设备均可通过商业化途径购买获得。

[0030] 实施例1.旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条。

[0031] 本实施例所述一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条,包括样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板,所述结合垫上标记有时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG;所述样品垫上设置有加样孔;所述层析膜上设有检测线与质控线,其中检测线上喷涂有旋毛虫肌幼虫ES混合抗原,所述旋毛虫肌幼虫ES混合抗原由旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原与旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原组成;所述质控线上喷涂有兔抗山羊IgG,所述样品垫材质为玻璃纤维素膜XQ-Y8;所述结合垫材质为玻璃纤维素膜Ahistrom8964;所述层析膜材质为硝酸纤维素膜Millipore135。

[0032] 实施例2.旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条的制备方法。

[0033] 1)旋毛虫肌幼虫ES混合抗原制备:将旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原及旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原,按照1:1的质量比混合,获得旋毛虫肌幼虫ES抗原;具体方法为:

[0034] 旋毛虫肌幼虫排泄分泌物(ML-ESP)抗原制备:

[0035] 将收集的旋毛虫肌幼虫用含有青霉素(500U/mL)和链霉素(500U/mL)的培养液洗涤三次(自然沉淀,每次20min),然后将其放入含青霉素(250U/mL)和链霉素(250U/mL)的培养液中(密度为5000条/mL),37℃,10%二氧化碳,培养18h-24h后收集上清。用一次性针头式过滤器过滤掉残留的肌幼虫及碎片后,收集的培养液上清先经PBS透析过夜然后经3KDa超滤管浓缩至2-3mg/mL,得到旋毛虫ML-ESP抗原并保存于-70℃备用。培养过程中务必保证培养基无细菌、真菌等污染,污染的抗原不能被使用。

[0036] 旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物(iML-ESP)抗原制备:

[0037] 将收集的旋毛虫肌幼虫经口感染雌性Wistar大鼠,6-8周龄,购自吉林大学实验动物中心Wistar大鼠(8000条/只),6h后处死,立即取出大鼠小肠,使用注射器用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗小肠,纵向和横向将小肠切割成1~2cm的碎片,放置于一个含有培养液的培养皿筛网上,37℃孵育3h。培养皿底部的虫体收集到15mL离心管中,用培养液洗涤3次,每次洗涤后2000×g,离心10min。将收集到的虫体用培养液培养18-24h,制备iML-ESP抗原方法同ML-ESP。

[0038] 检测抗原的制备:

[0039] 用0.01mol/L PBS缓冲液分别将旋毛虫ML-ESP及iML-ESP抗原稀释至浓度2mg/mL,将两种抗原按1:1比例充分混合(工作浓度均为1mg/mL)。

[0040] 2)结合垫的制备:将时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG喷涂在结合垫上,4℃真空抽干,于4℃干燥保存备用;具体方法为:

[0041] 利用EDC和NHS活化微球上的羧基,活化后的羧基与蛋白上的氨基结合,促使Eu-CM偶联上蛋白。

[0042] a)向100μL(1mg,1%(w/v))时间分辨荧光微球中,加入400μL 0.05mol/L 2-吗啉乙磺酸MES溶液,并借助超声设备分散,然后加入50μL N-羟基琥珀酰亚胺NHS(16mg/mL)和

50 μ L 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺EDC (8mg/mL) 混匀,室温孵育1-2h;反应结束后,离心后弃上清,0.02M磷酸缓冲液(PB,1.9ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.76g/L),8.1mL 3.56g/L ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)),漂洗2次后,500 μ LPB重悬。

[0043] b) 加入100 μ L的5mg/mL山羊抗猪IgG (0.01mol/L PBS缓冲液稀释),室温孵育1h。

[0044] c) 加入100 μ L的0.1mol/L甘氨酸溶液,室温孵育30min。

[0045] d) 4 $^{\circ}\text{C}$,8000 $\times$ g离心15min,弃上清。

[0046] e) 加入8000 μ L偶联储存液重悬。(Proclin300,0.05mL,BSA 1g,聚乙二醇400,2g,加0.05mol/L PBS溶液至100mL)

[0047] 将上述制备获得的含有偶联抗体山羊抗猪IgG的荧光微球用试纸喷膜仪喷涂至300 $\times$ 5mm玻璃纤维素膜Ahistrom8964上,速度为50 μ L/cm,4 $^{\circ}\text{C}$ 真空抽干,于4 $^{\circ}\text{C}$ 干燥保存备用。

[0048] 3) 检测线和质控线的制备:将旋毛虫肌幼虫ES混合抗原与兔抗山羊IgG按照1:0.625的质量比,分别喷涂在层析膜上,形成检测线与质控线,37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥2h,4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存备用;具体方法为:用浓度为1mg/mL旋毛虫ES混合抗原和0.625mg/mL兔抗山羊IgG (0.01mol/L PBS缓冲液稀释) 分别作为检测线和质控线试剂。用试纸喷膜仪将两种试剂分别点在硝酸纤维素膜Millipore135上,点样速度为1 μ L/cm。37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥2h。使用封闭剂(磷酸缓冲液PBS含质量分数为2%的BSA) 浸泡干燥后的硝酸纤维素膜Millipore135 1-2h,随后37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥1-2h,4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存备用。

[0049] 4) 试纸条的组装:在底板上沿检测时的层析方向依次将样品垫、结合垫、层析垫、吸水垫粘贴在底板上,制成纸卡,具体方法为:按图1示意图所示,将荧光专用黑色底板、样品垫XQ-Y8、结合垫Ahistrom8964、吸水垫H5072、硝酸纤维素膜Millipore135粘在一起,并用试纸条切割机将其切成3.5mm宽的试纸条,将试纸条放入试纸卡中,将试纸条放入含有干燥剂的密封袋内,密封后于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

[0050] 考察旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条灵敏性、特异性以及稳定性。

[0051] 1. 灵敏性试验:

[0052] 用旋毛虫荧光免疫层析检测试纸条检测不同感染条件下的猪血清中抗旋毛虫抗体,将检测结果和OIE提供的标准酶联免疫吸附抗体检测方法进行对比。确保检测中应用的试纸条来自同一批次。OIE提供的标准酶联免疫吸附方法的步骤如下:

[0053] (1) 包被液稀释肌幼虫ES抗原至5 μ g/ml,每孔0.5 μ g进行包被,于4 $^{\circ}\text{C}$ 静置12h。

[0054] (2) 弃去酶标板中的包被液,洗涤液洗涤3次。

[0055] (3) 加入100 μ L按1:50稀释处理后的猪血清,室温孵育30min。

[0056] (4) 重复步骤(2)。

[0057] (5) 加入100 μ L HRP标记的兔抗猪IgG,1:1000倍稀释,孵育30min。

[0058] (6) 重复步骤(2)后,加入100 μ L的TMB底物显色液。

[0059] (7) 10min后,在450nm波长条件下进行吸光度检测,如果发现所得结果为阴性的4倍判定为阳性。

[0060] 本发明试纸条与ELISA分别检测50份猪感染旋毛虫血清,结果显示ELISA检测48份血清为阳性,试纸条检测46份血清为阳性,其中ELISA 2份血清为阴性,旋毛虫也为阴性,而2份血清ELISA为阳性,试纸条为阴性。60份阴性血清,ELISA全为阴性,而试纸条58份为阴

性。说明两种方法在检测动物旋毛虫病方面一致率和吻合度较强；试剂盒和ELISA在敏感性和特异性上的差异均无统计学意义。说明本发明的敏感性和特异性与OIE推荐的猪旋毛虫病抗体检测方法(ELISA)相当,同时又具备操作简单、快速和结果易判读等ELISA不具备的优点,具有广泛推广空间,极具市场前景。

[0061] 2. 旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条的特异性检测:

[0062] 检测其他寄生虫阳性血清,主要有猪蛔虫、弓形虫、猪囊虫、日本血吸虫和华支睾吸虫阳性血清和阴性血清,并进行特异性分析。除猪旋毛虫阳性血清外,其他血清均为阴性,即旋毛虫荧光免疫层析检测试纸条不与其他寄生虫发生交叉反应,满足其特异性要求。

[0063] 3. 猪感染不同剂量及时间点旋毛虫检测:

[0064] 对感染旋毛虫后不同时间点猪血清的抗旋毛虫抗体检测,在重度感染时(20000条/只)消化法检测为每克肌肉幼虫数636.7-1257.61pg,ES ELISA 20-25天可以检测到旋毛虫感染,而试纸条可以在18-22天检测到旋毛虫感染。在中度感染时(1000条/只)消化法检测为每克肌肉幼虫数30.7-98.51pg,ES ELISA 30-40天可以检测到旋毛虫感染,而试纸条可以在25-35天检测到旋毛虫感染。在低度感染时(100条/只)消化法检测为每克肌肉幼虫数1.7-7.21pg,ES ELISA 35-50天可以检测到旋毛虫感染,而试纸条可以在35-40天检测到旋毛虫感染,与ES ELISA相比,基于肌幼虫ES抗原和肠道期感染性幼虫ES抗原的试纸条检测灵敏度明显提高,对旋毛虫病早期诊断也有一定价值。

[0065] 4. 田间样本分析:

[0066] 应用ELISA和荧光免疫层析检测试纸条对云南旋毛虫病高发地区13200多头圈养猪进行抗体检测,诊断为旋毛虫感染血清阳性的猪共13头,经消化法确证感染12头,准确率>99%

[0067] 5. 旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条的重复性:

[0068] 选择不同批次的试纸条进行重复性分析。分别用4个不同批次的试纸条检测,经ELISA检测后的30份猪旋毛虫感染阳性血清及20份正常猪阴性血清;4个不同批次的试纸条对30份阳性血清检测结果均为阳性,对20份阴性血清检测结果均为阴性,显示出本发明良好的灵敏性和特异性,且稳定性和重复性良好。

[0069] 6. 旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条的稳定性检测:

[0070] 将试纸条置于4℃和室温保存,每隔两周分别检测猪阳性和阴性血清各10份,共检测12次,敏感性和特异性均为100%,表明试纸条在4℃至少可保存6个月,即本发明的有效期至少为6个月。室温保存的试纸条第2周到第16周的结果敏感性和特异性均为100%,且检测线和控制线的颜色均不存在明显的差异。从第18周起,T线和C线的颜色均变浅,故室温环境下可保存16周。证明本发明具有长期稳定的特点,实用性较强、容易保存、具有市场开发价值。

[0071] 7. 旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条的稳定性验证结果:

[0072] 检测后试纸条分别保存于室温和4℃,室温条件下检测结果4个月时可分辨清楚,4℃条件下检测结果6个月时依然清晰可见,说明本发明的检测结果保存时间为室温至少4个月和4℃至少6个月,再次显示出本发明长期稳定的特点。

[0073] 实施例3. 旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条在旋毛虫病检测中的应用。

[0074] 样品稀释:分别用样品稀释液将旋毛虫抗体阳性血清(如猪感染旋毛虫血清)、阴

性血清(如正常猪血清)和待检血清(如猪血清)样品稀释20倍,即向95 μ L稀释液中加入5 μ L猪血清,用移液器混匀。将试纸条平放于操作台面,加样孔朝上,向加样孔中加入100 μ L稀释后的血清样品,室温静置5~10min。所述样品稀释液:氯化钠(NaCl) 9g,牛血清白蛋白(BSA) 2g,加双蒸水至1000mL配制而成。用紫外灯360-370nm照射试纸条观察结果。

[0075] 结果判定应在加样后20min内进行。阳性血清样品如果质控线和检测线均显色;阴性血清仅质控线显色,而检测线不显色;待测样品质控线显色,则试验成立,结果有效。

[0076] 待测样品如果质控线和检测线均显色,则判定为阳性;如果仅质控线显色,而检测线不显色,则判定为阴性;如质控线不显色,则检测无效,应更换试纸条重新检测。荧光免疫层析试纸条检测结果判定示意图见图2所示。

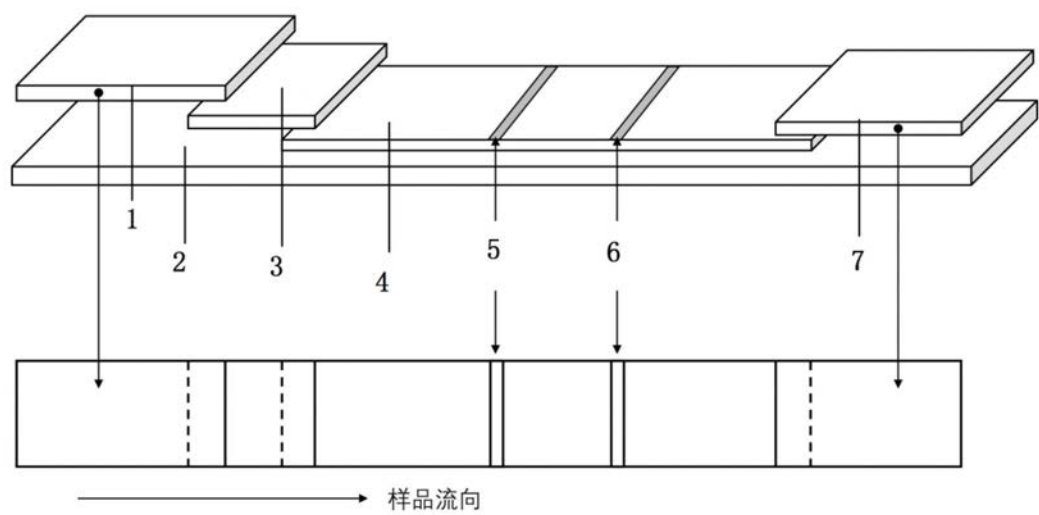


图1

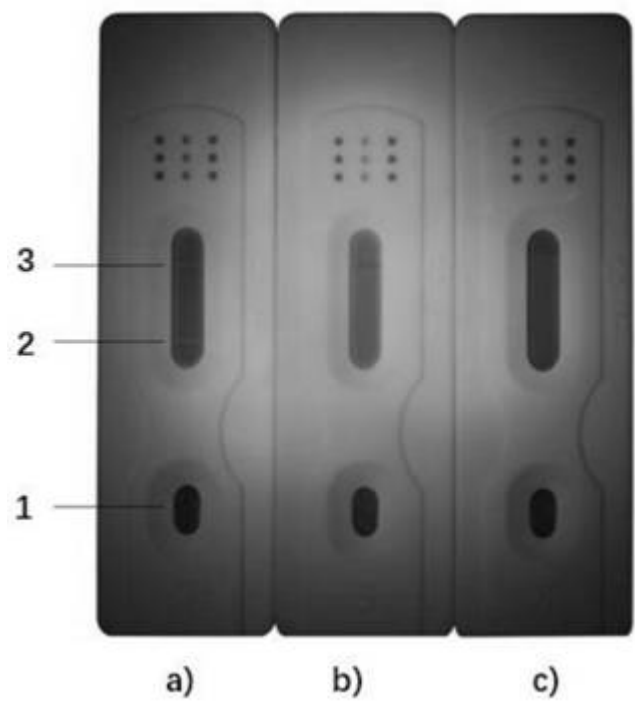


图2

专利名称(译)	一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN110221066A	公开(公告)日	2019-09-10
申请号	CN201910604044.8	申请日	2019-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	刘明远 刘晓雷 杨勇 王学林 白雪 唐斌 丁静 王楠 张小波		
发明人	刘明远 刘晓雷 杨勇 王学林 白雪 唐斌 丁静 王楠 张小波		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/569 G01N2021/6439		
代理人(译)	邓宇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条及其制备方法与应用，属于荧光免疫检测技术领域。为了更快速、稳定、准确检测旋毛虫感染，本发明提供了一种旋毛虫病荧光免疫层析检测试纸条，包括样品垫、结合垫、层析膜、吸水垫和底板，所述结合垫上标记有时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪IgG；所述层析膜上设有检测线与质控线，其中检测线上喷涂有旋毛虫肌幼虫排泄分泌物ML-ESP抗原与旋毛虫肠道期肌幼虫排泄分泌物iML-ESP抗原组成的旋毛虫肌幼虫ES混合抗原；所述质控线上喷涂有兔抗山羊IgG，将上述各组分组合后制备成试纸条，本发明可用于猪旋毛虫病的快速检测。

